

P-277 ヒト卵巣表層上皮培養上清中のtPA抗原, PAI-1抗原の測定

熊本大,

大竹秀幸, 福松之敦, 岩政 仁, 田中信幸,
片瀨秀隆, 岡村 均

〔目的〕 Ratでは卵胞液や顆粒膜細胞からtissue type plasminogen activator (tPA), plasminogen activator inhibitor (PAI) 産生が証明されており, tPA-Plasmin systemが排卵時の卵胞壁破裂の機序に深く関与していることが推察されている。そこで卵胞壁を構成する卵巣表層上皮 (OSE) でのtPA, PAI-1抗原産生の有無をその培養上清を用いて測定した。更にhuman chorionic gonadotropin (hCG), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor basic (bFGF) のtPA抗原, PAI-1抗原産生への影響を検討した。

〔方法〕 医学的適応において摘出されたヒト卵巣より, Scrape method (H6年報告) によりOSEを採取しD-MEM/HAMF12 FBS15%にて培養した。

1~2回目の継代後のOSEを細胞数 1×10^4 /well (96multi-well) で72時間培養後, 無血清培養液にて24時間, 48時間培養し培養液を採取した。更に同時に, 培養液にhCG (1, 10IU/ml), bFGF (0.1, 1ng/ml), EGF (0.1, 1 ng/ml) を添加した。tPA抗原, PAI-1抗原はELISA法 (biopool社) にて測定した。

〔成績〕 OSE培養上清中にはtPA抗原は測定感度以下であったが, PAI-1抗原は9.8 ng/ml (24時間), 50.8ng/ml (48時間) 認められた。又, EGF添加により24時間培養時にtPA抗原値の上昇2.3ng/ml, hCG添加により48時間培養時にPAI-1抗原量の低下12.8 ng/mlが見られた。

〔結論〕 ヒトOSEにおいてもEGF等のcytokineやgonadotropinの影響下にtPA-Plasmin systemが関与している可能性が示唆された。

P-278 卵巣におけるミドカインの発現調節

群馬大

狩野 智, 峯岸 敬, 中村和人, 中村 学
田野真理, 篠崎博光, 伊藤郁朗, 伊吹令人

〔目的〕 ミドカインはヘパリン結合能を持った一群の成長因子の一つである。最近牛の卵胞液中にも多量のミドカイン蛋白が存在することが示され, 卵胞発育における局所調節因子としての可能性が示唆された。そこで今回我々は卵胞発育におけるミドカインの産生を検討するため, PMSG-hCG処理ラット卵巣を用いてミドカインmRNAの経時変化及び局在をノーザンプロット法及びIn Situ Hybridization (ISH)法により検討した。〔方法〕 ヒト-ミドカインcDNAを用いてジゴキシゲニン標識センス, アンチセンスRNAプローブを作成し, ノーザンプロット法及びISH法に使用した。ウイスター系幼若メスラットにPMSG30IUを投与した後, 60時間後にhCG20IUを投与し, hCG投与前日, 当日, 2, 4, 6, 8日後にそれぞれ卵巣を摘出, 直ちに液体窒素にて凍結RNAを抽出し, ノーザンプロット法を行った。同様に処理したラットよりhCG投与後2日後に卵巣を摘出し, コンバウンド中に包埋し直ちに液体窒素中にて凍結した後, 切片を作成し, ISH法を行った。〔成績〕 ノーザンプロット法にてミドカインmRNAは約1Kb付近においてバンドが認められ, PMSG処理にて増加し, その後のhCG投与にて減少した。またISH法にてミドカインmRNAは卵胞の発育段階とは関係なく顆粒膜細胞に局在する事が示された。〔結論〕 ミドカインが顆粒膜細胞で卵胞発育の初期から合成され, ゴナドトロピンによる正の調節を受け, その黄体化とともに産生が減少する事を初めて証明した。ミドカインの作用としては培養系での神経線維の伸張作用が以前より報告されているが, 本実験により卵胞発育に対する局所調節因子としての可能性が示された。